

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 121—122

Photometrische Bestimmung des Kupfers im Serum ohne Enteiweißung

VON GERLINDE BEYER und G. HILLMANN

Aus dem Chemischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. G. Hillmann) der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg

(Eingegangen am 30. August/11. Dezember 1972)

Herrn Prof. Dr. Heinrich Dannenberg zum 60. Geburtstag gewidmet

Kupfer wird aus seiner Bindung an Coeruloplasmin durch H_2O_2 bei pH 5,5 in Gegenwart von Harnstoff und Hydroxypolyäthoxydodecan freigesetzt. Nach Reduktion mit Natriumascorbat wird der Kupfer (I)-Bathocuproinkomplex photometrisch gemessen.

Photometric determination of copper in serum without deproteinization

Copper was released from caeruloplasmin by treatment with H_2O_2 at pH 5.5 in the presence of urea and hydroxypolyethoxydodecane. The copper (I) bathocuproin complex was measured photometrically after reduction with sodium ascorbate.

Alle bisher bekannten indirekten photometrischen Methoden zur Bestimmung von Kupfer im Serum mit spezifischen Komplexbildnern erfordern eine vorherige Spaltung der stabilen Kupfer-Eiweiß-Bindung durch Inkubation mit starken Säuren (1). Die photometrische Messung der Kupferkomplexe erfolgt nach Entfernung des Eiweißes durch Präzipitation oder Dialyse (2).

Die nachstehend beschriebene neue Methode beruht auf der Oxidation der kupferbindenden Eiweißgruppen durch H_2O_2 in Gegenwart eines nichtionischen Detergens (Hydroxypolyäthoxydodecan = Thesit) und Harnstoff bei Raumtemperatur bzw. 50°C. Die optimale Zusammensetzung des Spaltungsreagenzes wurde empirisch ermittelt. Wir fanden, daß durch Harnstoff und Thesit die Abspaltung des Kupfers beschleunigt und das Auftreten von Trübungen durch Lipide und präzipitierte Proteine verhindert wird. Gleichzeitig werden endogene Serumfarbstoffe oxidativ eliminiert. Für die Kupferbestimmung hat sich die Anwendung von Bathocuproindisulfonat nach Reduktion mit Ascorbinsäure als geeignet erwiesen. Versuche mit anderen Komplexbildnern für Kupfer wie Diäthyl-dithiocarbamat, Neocuproin, Cuprizon, Oxalyldihydrazid/Acetaldehyd, Dithizon, Diphenylcarbazon führten zu keinem brauchbaren Ergebnis. Die angegebene Methode ermöglicht eine geringere Probenverdünnung (1:1) als bei den üblichen Verfahren mit Eiweißfällung (1:2) und damit eine erhöhte Empfindlichkeit. Die Methode erfordert eine zusätzliche Messung der jeweiligen Serumblindwerte in Analogie zur Bestimmung des Serumeisens ohne Enteiweißung mit Bathophenanthroindisulfonsäure (3).

Die Vorteile unserer Methode bestehen

1. in der Vermeidung der Eiweißfällung
2. in der Anwendungsmöglichkeit für diskontinuierliche Mechanisierung

3. in der Anwendung für lipämische und hyperbilirubinämische Seren.

4. in der bereits genannten höheren Empfindlichkeit. Mit dieser Methode wurden bisher 2000 Serum-Kupferbestimmungen störungsfrei durchgeführt.

Reagenzien und Geräte

Spektral- oder Spektrallinienphotometer.
Einwegröhrchen aus Kunststoff mit Stopfen (Fa. Sarstedt).

Reagenzien

1. primäres Natriumphosphat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ Merck 6346)
2. sekundäres Natriumphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ Merck 6580).
3. Harnstoff (Merck 8487)
4. Thesit (Hydroxypolyäthoxydodecan Desitin-Werk Carl Klinke Hamburg)
5. Wasserstoffperoxid 30% (Merck 7209)
6. Natriumascorbat (Merck 500076)
7. Bathocuproindisulfonsäure-Dinatriumsalz p. a. (Merck 1654)
8. Kupfersulfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ p. a. Merck 2790)
9. Salpetersäure konz. Dichte 1,4 p. a. (Merck 454).

Lösungen

I. 0,5 mol/l Phosphatpuffer pH 5,5

a) 0,5 mol/l NaH_2PO_4 (69 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O/l$)

b) 0,5 mol/l Na_2HPO_4 (89 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O/l$).

Beide Lösungen werden im Verhältnis 100 ml (Ia) + 15 ml (Ib) vermischt. Eine genaue Einstellung des pH-Wertes mit der Glaselektrode ist nicht erforderlich.

II. Spaltungsreagenz

100 ml Phosphatpuffer pH 5,5 werden mit 5 ml Thesit und 50 g Harnstoff versetzt. Die Substanzen lösen sich leicht unter fließendem heißen Wasser. Nach dem Abkühlen der Lösung werden 21 ml Wasserstoffperoxid zugesetzt. (Haltbarkeit des Spaltungsreagenzes bei Raumtemperatur etwa 2 Wochen.)

III. Natriumascorbatlösung 1 mol/l in Wasser (198 g/l).
Die erforderliche Menge wird jeweils frisch angesetzt.

IV. Bathocuproindisulfonsäure-Dinatriumsalz 10 g/l Wasser

V. Kupfer-Stammlösung

0,392 g Kupfersulfat werden in etwa 50 ml Wasser gelöst und 27 ml konzentrierte Salpetersäure zugegeben. Auffüllen mit Wasser (bidest.) auf 1 Liter.

VI. Kupfer-Standardlösung

5 ml der Kupfer-Stammlösung werden mit Wasser auf 200 ml verdünnt (2500 µg/l in 0,01 mol/l HNO₃).

Durchführung der Bestimmung

Bestimmungsansatz

| | Blindwert | Standard | Probe |
|--|-----------|----------|--------|
| bidest. Wasser | 2,0 ml | — | — |
| Standardlösung | — | 2,0 ml | — |
| Serum | — | — | 2,0 ml |
| Spaltungsreagenz | 2,0 ml | 2,0 ml | 2,0 ml |
| mischen, etwa 10 min offen stehen lassen (Schaumbildung), verschließen, 2 h bei 50°C oder über Nacht bei Raumtemperatur reagieren lassen | | | |
| Natriumascorbat-lösung | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
| mischen, Ansätze teilen durch Abpipettieren von 2 ml | | | |
| | ↓ | ↓ | ↓ |
| | B 1 | B 2 | St 1 |
| | | | St 2 |
| | | | P 1 |
| | | | P 2 |
| Bathocuproindisulfonat-Lösung | — | 20 µl | — |
| Ansätze mischen, 30 min stehen lassen (Stabilität > 4 h). | | | |
| | | 20 µl | — |
| | | | 20 µl |

Messung

Wellenlänge 460—490 nm (492 nm bei Filterphotometern).

Glasküvette 1 cm Schichtdicke (Durchflußküvette).

Messung Probe 1 gegen Blindwert 1.

Standard 2 und Probe 2 gegen Blindwert 2.

$$\text{Berechnung: } \frac{(\text{Ext. Probe 2} - \text{Ext. Probe 1}) \cdot 2500}{\text{Ext. Standard}} = \mu\text{g/l.}$$

$$\mu\text{g/l} \cdot 0,0157 = \mu\text{mol/l.}$$

Ergebnisse

Präzision in der Serie (N = 30).

Mittelwert \bar{x} 1265 µg/l.

Standardabweichung $s \pm 34,4$ µg/l.

Variationskoeffizient VK = 2,71%.

Präzision von Tag zu Tag (N = 50)

Mittelwert \bar{x} 1643 µg/l.

Standardabweichung $s \pm 61,3$ µg/l.

Variationskoeffizient VK = 3,73%.

Richtigkeit

Vergleichsbestimmungen mit Enteiweißung (N = 40, Komplexbildner Bathocuproindisulfonat)

Korrelationskoeffizient $r = 1,0019$

Wiederfindungsrate bei Zusatzversuchen 98%.

Arbeitszeit

Pro Analyse = 1 min (manuelle Technik mit Durchflußküvette bei Serienbestimmungen).

Die Durchführung von Mikroanalysen unter Einsatz von 500 µl Serum ist mit entsprechend reduzierten Ansätzen möglich, jedoch für Serienbestimmungen mit Durchflußküvetten nicht geeignet.

Literatur

- HINSBERG, K. & LANG, K. (1957), Medizinische Chemie, 3. Aufl., S. 38—41, Verlag Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien.
- ZAK, B. (1958), Clin. Chim. Acta 3, 328—334.
- ZAK, B. & RESSLER, N. (1956), Anal. Chem. 28, 1158—1161.
- EDAM, K. (1962), Ärtzl. Praxis 14, 1911—1912.
- FRIEDMANN, H. S. & CHEEK, C. S. (1971), Clin. Chim. Acta 31, 315—327.
- FÜHR, J. & STARY, E. (1970), Ärtzl. Lab. 16, 244 bis 253.
- KLEIN, B., KLEINMANN, N. & SEARCY, R. L. (1970), Clin. Chem. 16, 495—499.
- LEPPLA, W., BROKATE, W. & KELLER, H. E. (1963), in Internat. Techn. Sympos. Automat. Analyt. Chemie, S. 225—229.
- SCHMIDT, R., WEIS, W., KLINGMÜLLER, V. & STAUDINGER, H. J. (1967), diese Z. 5, 304—309.
- YOUNG, D. S. & HICKS, J. M. (1965), J. Clin. Pathol. 18, 98—102.
- ZAK, B. & EPSTEIN, E. (1964), in Internat. Techn. Symp. Automat. Analyt. Chemie S. 485—492.
- ZAK, B. & EPSTEIN, E. (1965), Clin. Chem. 11, 641—644.
- SUMMERS, R. M. (1960), Anal. Chem. 32, 1903 bis 1904.
- KATTERMANN, R. & KÖHRING, B. (1971), diese Z. 9, 391—395.
- KLEIN, B., LUCAS, L. B. & SEARCY, R. L. (1969), Clin. Chim. Acta 26, 517—523.
- KLEIN, B., WEBER, B. K., LUCAS, L., FOREMAN, J. A. & SEARCY, R. L. (1969), Clin. Chim. Acta 26, 77—84.
- BEALE, R. N. & CROFT, D. (1964), J. Clin. Pathol. 17, 260—263.
- SCHADE, A. L., OYAMA, J., REINHART, R. W. & MILLER, J. R. (1954), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87, 443—448.
- FÜHR, J. (1965), Med. Monatsschr. Stuttgart 19, 281—283.

Prof. Dr. G. Hillmann
Städt. Krankenanstalten Nürnberg
Chemisches Institut
85 Nürnberg
Flurstraße 17